

⑫ **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

⑲ Anmeldenummer: 87107793.9

⑳ Anmeldetag: 29.05.87

⑤① Int. Cl.4: **C12P 13/06** , **C12P 13/04** ,  
**C12N 15/00** , **C12N 1/20** ,  
/(C12N1/20,C12R1:01,1:38,1:4-  
25)

Der Anmelder hat eine Erklärung nach Regel 28 (4) EPÜ (Herausgabe einer Probe nur an einen Sachverständigen) eingereicht.  
Eingangsnummer(n) der Hinterlegung(en): DSM 4115, DSM 4114, DSM 4120, DSM 4119, DSM 4118, DSM 4116, DSM 4122, DSM 4121, DSM 4113, DSM 4117.

③① Priorität: 04.06.86 DE 3618812

④③ Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
09.12.87 Patentblatt 87/50

⑨④ Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

⑦① Anmelder: **HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT**  
Postfach 80 03 20  
D-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

⑦② Erfinder: **Then, Johann, Dr.**  
Sulzbacher Weg 2  
D-6238 Hofheim am Taunus(DE)  
Erfinder: **Bartsch, Klaus, Dr.**  
Memelstrasse 2  
D-6233 Kelkheim (Taunus)(DE)  
Erfinder: **Deger, Hans-Matthias, Dr.**  
Am Rheingauer Weg 8  
D-6238 Hofheim am Taunus(DE)  
Erfinder: **Grabley, Susanne, Dr.**  
Hölderlinstrasse 7  
D-6240 Königstein/Taunus(DE)  
Erfinder: **Marquardt, Rüdiger, Dr.**  
Günthersburgallee 69  
D-6000 Frankfurt am Main(DE)

⑤④ Verfahren zur Herstellung von L-tertiär-Leucin und L-Phosphinothricin durch Transaminierung.

⑤⑦ L-tertiär-Leucin und L-Phosphinothricin sind durch Transaminierung der entsprechenden Ketosäuren als Vorstufe in Gegenwart von Aminosäuren als Aminogruppendonatoren erhältlich. Die Reaktion wird bevorzugt mit Mikroorganismen bzw. deren Transaminasen durchgeführt.

**EP 0 248 357 A2**

# Verfahren zur Herstellung von L-tertiär-Leucin und L-Phosphinothricin durch Transaminierung.

Optisch aktive, nicht-proteinogene Aminosäuren haben große Bedeutung aufgrund ihrer bekannten oder potentiellen biologischen Aktivität. Einige werden erfolgreich im pharmazeutischen Bereich eingesetzt, wie L-Dihydroxyphenylalanin (L-Dopa) oder  $\alpha$ -Methyldopa, oder finden im Pflanzenschutz Anwendung, wie Phosphinothricin. Andere sind Vorstufen von Pharmazeutika, wie D-Phenylglycin oder  $\beta$ -p-Hydroxyphenylglycin bei der Herstellung der semisynthetischen Penicilline Ampicillin und Amoxycillin. Sie können auch wertvolle Vorstufen für die Synthese von Feinchemikalien sein. In die asymmetrische Synthese von Aminosäurederivaten hat insbesondere auch tertiär-Leucin Eingang gefunden [U. Schöllkopf, Pure and Appl. Chem., 55 1799-1806, (1983)].

Die nicht-proteinogenen optisch aktiven Aminosäuren werden bevorzugt nur auf chemischem Weg hergestellt. Dabei ist nachteilig, daß nicht stereoselektiv gearbeitet werden kann und man das Racemat als Endprodukt erhält. Enzymatische Verfahren haben demgegenüber sehr oft den Vorteil, daß aus einfach herzustellenden Vorstufen mit Hilfe eines Enzymschritts eine chirale Verbindung selektiv synthetisiert werden kann. Dies ist insbesondere vorteilhaft wenn nur eine der beiden stereoisomeren Verbindungen biologisch aktiv ist.

Die Synthese von natürlichen, sogenannten proteinogenen Aminosäuren durch Biotransformation mit Transaminasen ist an sich bekannt. In der Europäischen Patentanmeldung 152 275 wird ein Verfahren zur Herstellung von Phenylalanin durch Transaminierung mit Hilfe eines genetisch modifizierten Mikroorganismus beschrieben, der sich durch Überproduktion der Aminotransferase auszeichnet. Nach der Europäischen Patentanmeldung 135 846 erfolgt die Herstellung von natürlichen L-Aminosäuren derart, daß  $\alpha$ -Ketosäuren mit L-Asparaginsäure als Aminogruppendonator in Gegenwart einer Transaminase umgesetzt werden, die aus E. coli isoliert wurde. Es entstehen die der  $\alpha$ -Ketosäure entsprechenden L-Aminosäuren sowie Oxalacetat aus der Asparaginsäure.

Die Selektion und Mutation von Mikroorganismen aus der Reihe E. coli, Paracoccus denitrificans, Torula, Rhodotorula und Streptomyces zur Herstellung von L-Phenylalanin aus Phenylbrenztraubensäure mit verbesserter Ausbeute wird in der Deutschen Patentanmeldung DE 3 423 936 dargestellt.

Nicht natürliche vorkommende, sogenannte nicht-proteinogene, Aminosäuren werden bislang nicht durch enzymatische Biotransformation hergestellt.

Es wurde nun gefunden, daß die Synthese der nicht-proteinogenen Aminosäuren L-tertiär-Leucin und L-Phosphinothricin in sehr guter Ausbeute mit Hilfe der Transaminierung durchgeführt werden kann. Dies ist insofern überraschend, als zwar bekannt war, daß mit Transaminasen verschiedene natürliche proteinogene Aminosäuren synthetisiert werden können, aufgrund der Spezifität der Enzyme jedoch nicht erwartet werden konnte, daß nicht-proteinogene Aminosäuren mit nicht-natürlich vorkommenden  $\alpha$ -Ketosäuren als Vorstufe ebenfalls auf diesem Weg hergestellt werden können. Aufgrund dessen ist es überraschend, daß die entsprechenden Vorstufen trotz ihres hydrophoben Restes, die in den Vorstufen zu natürlichen Aminosäuren so nicht vorkommen, von dem aktiven Zentrum der Transaminase toleriert und umgesetzt werden.

Die Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Herstellung von L-tertiär-Leucin und L-Phosphinothricin, das dadurch gekennzeichnet ist, daß 3,3-Dimethyl-2-oxo-butansäure und (3-carboxy-3-oxo-propyl)-methylphosphinsäure oder jeweils die entsprechenden Salze in Gegenwart von Aminogruppendonatoren transaminiert werden.

Im folgenden wird die Erfindung detailliert erläutert bzw. in den Patentansprüchen definiert.

Enzyme zahlreicher Organismen, beispielsweise aus Mikroorganismen, Pflanzen und tierischen Organen, wie Schweineherz sind in der Lage,  $\alpha$ -Ketosäuren durch Transaminierung in natürlich L-Aminosäuren umzuwandeln. Diese Organismen bzw. deren Enzyme können erfindungsgemäß eingesetzt werden. Bevorzugt wird jedoch mit Mikroorganismen gearbeitet, die eine Transaminase besitzen, wie zum Beispiel Mikroorganismen der Gattungen Paracoccus, Alcaligenes, Rhizobium, Pseudomonas, Serratia, Agrobacterium, Streptomyces sowie Enterobakterien. Insbesondere vorteilhaft sind Mikroorganismen, wie beispielsweise Alcaligenes faecalis DSM 4115, Alcaligenes denitrificans DSM 4114, Pseudomonas paucimobilis DSM 4120, Pseudomonas spec. DSM 4119, Serratia plymuthica DSM 4116, Agrobacterium tumefaciens, Escherichia coli DH1, Escherichia coli ATCC 11303, Enterobacter agglomerans DSM 4122, Enterobacter spec. DSM 4121, Paracoccus denitrificans DSM 65, Streptomyces hygroscopicus und Streptomyces viridochromogenes sowie 3 Bodenisolat DSM 4113, DSM 4117 und DSM 4118. Diese Mikroorganismen wurden, sofern sie nicht frei erhältlich oder nacharbeitbar beschrieben waren, bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen (DSMZ) hinterlegt.

Man kann höhere Enzymaktivitäten erhalten, wenn man Stämme selektioniert, die gegen Phosphinothricin resistent sind oder Phosphinothricin als alleinige Stickstoffquelle nutzen, beispielsweise *Alcaligenes faecalis* DSM 4115, *Agrobacterium tumefaciens* sowie das Bodenisolat DSM 4113. Dies ist vorteilhaft, jedoch nicht unbedingt notwendig. Ebenso können durch Selektion und Mutation, in an sich bekannter Weise, gegen steigende Mengen von 3,3-Dimethyl-2-oxo-butansäure, Phenylbrenztraubensäure bzw. (3-carboxy-3-oxo-propyl)-methylphosphinsäure oder deren Salze in den Anzuchtmedien für die weiteren Arbeiten Mikroorganismen ausgewählt werden, die aufgrund ihrer Adaptation an die  $\alpha$ -Ketosäure die Transaminierung in besseren Ausbeuten durchführen. 3,3-Dimethyl-2-oxo-butansäure bzw. deren Salze sind leicht zugänglich durch Verseifen von Trimethyllessigsäure in Gegenwart von Thionylchlorid und KCN nach klassischen Methoden. Die Herstellung von (3-carboxy-3-oxo-propyl)-methylphosphinsäure bzw. deren Salze erfolgt ebenso nach bekannten Methoden (Hans Beyer, Lehrbuch der organischen Chemie, S. Hirzel Verlag, Stuttgart).

Gute Ausbeuten werden auch erreicht, wenn gentechnisch manipulierte Mikroorganismen in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden. Besonders bevorzugt wird mit *E. coli* ATCC 11303 gearbeitet, der mit einem ein *tyrB*-Gen bzw. *ilvE*-Gen enthaltenden Plasmid transformiert wurde, wobei das *tyrB*-Gen für die aromatische Transaminase und *ilvE* für die aliphatische Transaminase jeweils in *E. coli* kodiert. Derartig manipulierte Stämme können beispielsweise nach der Deutschen Patentanmeldung P 36 31 829.9 bzw. P 36 36 722.2 hergestellt werden.

Die Transaminierung kann gleichzeitig mit der Kultivierung erfolgen, wobei dann vorzugsweise mit Mikroorganismen gearbeitet wird, die gegen Phosphinothricin resistent sind, beispielsweise *Alcaligenes faecalis* DSM 4115 und *Agrobacterium tumefaciens*. Die Mikroorganismen werden jedoch vorteilhaft in einem für ihr Wachstum optimalen Nährmedium unter entsprechenden günstigen Temperatur- und Belüftungsbedingungen bis zu einem Trockengewicht von etwa 4 bis 60 g/l Nährlösung angezogen. Die für den jeweiligen Mikroorganismus günstigsten Bedingungen sind dem Fachmann entweder bekannt oder können in einfachen Vorversuchen festgestellt werden. Die Zellen werden dann, in der Nährlösung oder von der Nährlösung abgetrennt, zur Aminierung der  $\alpha$ -Ketosäuren eingesetzt. Die Transaminierung kann mit ganzen oder auch mit aufgeschlossenen Zellen durchgeführt werden, wobei die üblichen Aufschlußmethoden angewendet werden. Es ist ebenfalls möglich, die Transaminierung mit Zellextrakten, isolierten Gesamtproteinen sowie gereinigten Transaminasen durchzuführen. Aus praktischen Überlegungen beispielsweise aus Kostengründen, wird jedoch bevorzugt mit intakten Zellen gearbeitet. Jedoch kann die Isolierung der Transaminasen aufgrund einer längeren Lebensdauer des Enzyms sowie einer besseren Regulierbarkeit der Reaktion ebenfalls vorteilhaft sein. Es ist weiterhin möglich, die Mikroorganismen oder die Enzyme in fixierter Form einzusetzen. Für die Fixierung kommen die bekannten Verfahren in Betracht, vorteilhaft die Methoden nach den Deutschen Offenlegungsschriften 32 37 341 und 32 43 591.

Die Mikroorganismen bzw. das isolierte Enzymsystem werden in der bevorzugten Ausführungsform in einem physiologischen Puffer suspendiert, so daß deren Transaminaseaktivität nicht nennenswert negativ beeinflußt wird, unter Zugabe der  $\alpha$ -Ketosäure und des Aminogruppendonators. Je nach Menge der Mikroorganismen kann die dem Ansatz zugegebene enzymatische Aktivität in Form von Mikroorganismen oder des isolierten Enzymsystems in weiten Bereichen schwanken. Zweckmäßig liegt sie zwischen 10 bis 20.000  $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g}$ . Vorzugsweise enthält der Ansatz Zellmengen mit einer Enzymaktivität von 1500-2000  $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g}$ .

Als Aminogruppendonator finden Aminosäuren Anwendung. Welche Aminosäure vorteilhaft eingesetzt wird ist weitgehend von dem Mikroorganismus bzw. dem isolierten Enzymsystem abhängig, was jedoch in kurzen Vorversuchen festgestellt werden kann. Geeignet sind beispielsweise Valin, Leucin, Isoleucin, Methionin, Tryptosin und Phenylalanin, insbesondere Asparagin, Asparaginsäure, Glutamin, Glutaminsäure und Glycin. Diese Aminosäuren werden in der L-Form, da nur diese erfindungsgemäß verwertet wird, als freie Säure oder geeigneten Salze (entsprechend dem verwendeten Medium) eingesetzt. Zur Herstellung von L-tertiär-Leucin wird 3,3-Dimethyl-2-oxo-butansäure eingesetzt, während für die Herstellung von L-Phosphinothricin als  $\alpha$ -Ketosäure (3-carboxy-3-oxo-propyl)-methylphosphinsäure verwendet wird. Es können auch deren Salze verwandt werden, wobei natürlich Ionen gewählt werden, die die Transaminaseaktivität nicht nennenswert negativ beeinflussen. Bevorzugt sind dies Natrium-, Kalium- und Ammoniumsalze. Der Aminogruppendonator wird in äquimolaren Mengen bzw. im Überschuß zur  $\alpha$ -Ketosäure zugegeben. Verhältnisse von 1:1 bis 5:1, vorteilhaft 1:1 bis 2:1, haben sich bewährt.

Die Zugabe der Reaktionskomponenten zum Reaktionsansatz kann als Lösung in Wasser oder durch Zugabe der festen Substanzen gleichzeitig erfolgen. Bevorzugt ist jedoch eine gestaffelte bzw. kontinuierliche Zugabe in Mengen von 0,1-4,5 % insbesondere 0,2-2 %, jeweils bezogen auf das Gewicht des Reaktionsansatzes, über einen Zeitraum von 1-90 Stunden, vorzugsweise 2-40 Stunden.

Es wird vorteilhaft bei einem pH-Wert zwischen 5 und 9, insbesondere zwischen 7 und 8,5, gearbeitet. Es ist außerdem zweckmäßig, die Transaminierung in einem Temperaturbereich von 10°-65°C, insbesondere 20 bis 50°C, durchzuführen. Bei niedrigeren Temperaturen verläuft die Enzym-Reaktion zunehmend langsamer, während das Enzym bei höheren Temperaturen fortschreitend desaktiviert wird.

5 Die günstigste Vorgehensweise hängt von dem jeweiligen Mikroorganismus ab und kann in einfachen Vorversuchen leicht festgelegt werden.

Es hat sich besonders bewährt, die Mikroorganismen vor bzw. während der Transaminierungsreaktion zu permeabilisieren. Dies kann durch Zugabe geeigneter Agenzien, wie Toluol, Cetyltrimethylammoniumbromid, Dimethylsulfoxid etc., zum Inkubationsmedium erfolgen.

10 Die anschließenden Beispiele dienen dazu, die vorgestellte Erfindung weiter zu illustrieren. Prozentangaben beziehen sich, wenn nicht anders angegeben, auf das Gewicht.

### Beispiel 1

15

#### Anzucht und Aufarbeitung der Mikroorganismen

Die genannten hinterlegten und frei erhältlichen Bakterien wurden in 400 ml Flüssigkulturen in LB-Medium [Luria-Bertani-Medium: 10 g Bacto-Trypton/5 g Bacto-Yeast-Extrakt/10 g NaCl pro Liter, (pH 7,5)] oder M9-Minimalmedium [6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/0,5 g NaCl/1 g NH<sub>4</sub>Cl/2 ml 1 M MgSO<sub>4</sub> + 10 ml 20 % Glucose + 0,1 ml 1 M CaCl<sub>2</sub> + 1 ml 1% Vitamin B1 (Thiamin) pro Liter (pH 7,4)] bei 30°C (alle Bakterien außer E. coli) bzw. 37°C (E. coli, DH1) über Nacht kultiviert.

Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert und die Zellpellets mehrfach in 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM NaCl (pH = 7,0) (Waschpuffer) gewaschen und schließlich in 5 ml Waschpuffer pro 3 g Zellpellet suspendiert. Die Zellen wurden durch 5 × 1 min. Ultraschall aufgeschlossen und die Zelltrümmer danach abzentrifugiert. Die so gewonnenen Lysat-Überstände können mehrere Monate bei -20°C aufbewahrt werden.

### 30 Beispiel 2

#### Proteinisolierung

Zur Proteinisolierung wurden je 5 ml der Lysat-Überstände mit Waschpuffer auf 50 ml aufgefüllt und die Proteine durch Zugabe von Ammoniumsulfat auf 65 % ausgefällt. Nach dem Abzentrifugieren über 15 min. bei 10000 g wurden die Proteinpellets in je 5 ml 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,0) 1 mM EDTA, 2 % Glycerin, 1 mM Dithiothreitol (DTT) resuspendiert. Diese Suspension kann ebenfalls bei -20°C aufbewahrt werden. Um einen besseren Reinigungseffekt zu erzielen, wurden die Proteine teilweise zweimal mit Ammoniumsulfat gefällt.

40 Proteinbestimmungen wurden nach der Biuret-Methode vorgenommen. Der Proteingehalt in den nach obigem Protokoll durchgeführten Präparationen lag meist zwischen 5 und 10 mg/ml. Zur partiellen Reinigung der Transaminasen aus *Alcaligenes faecalis* DSM 4115 und aus DSM 4113 wurden die Proteine mit 25 % bis 75 % Ammoniumsulfat, jeweils in 10 %-Schritten zugegeben, fraktioniert gefällt und die Einzelfractionen auf Transaminase-Aktivität getestet (siehe unten). Die Proteinfraction mit der größten spezifischen Aktivität wurden auf eine Sephadex G 100-Gelfiltrationssäule aufgetragen und mit 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,0) eluiert. Die Eluat-Fractionen mit der höchsten spezifischen Transaminase-Aktivität wurde durch erneute Ammoniumsulfat-Fällung konzentriert und 5 mg/ml in 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,0), 1 mM EDTA, 2 % Glycerin, 1 mM DTT aufgenommen. Die Molekulargewichte der (Sephadex G 100) Polydextran-Säulenfraktionen wurden durch Vergleich mit Molekulargewicht-Standard-Proteinen bestimmt. Die Reinheit der isolierten Transaminase-Fractionen konnte durch Elektrophorese von Proteinproben in 10 %igen SDS/Polyacrylamid-Gelen überprüft werden.

### Beispiel 3

55

## Phosphinothricin-Synthese-Tests in Flüssigkulturen

Es wurden jeweils 5 ml-Kulturen der Bakterienstämme in LB-Medium mit 3 g/l (20 mM) L-Glutaminsäure als einziger N-Quelle und 2 g/l (10 mM) Natrium-(3-carboxy-3-oxo-propyl)-methylphosphinat bei 30°C kultiviert. Nach 1 und 2 Tagen wurden 1 ml-Proben entnommen und die Bakterienzellen durch Erhitzen auf 95°C über 20 min. abgetötet. Nach Zentrifugation wurden die Überstände abgenommen und auf Phosphinothricin-Bildung im Aminosäureanalysator (AS-Analysator) untersucht. *Alcaligenes faecalis* DSM 4115 setzt die Substrate nach 24 Stunden zu 0,3 g/l L-Phosphinothricin (15 % Umsatz, bezogen auf  $\alpha$ -Ketosäure) um. Nach 48 Stunden erhält man 5 g/l L-Phosphinothricin (25 % Umsatz).

Beispiel 4

## Transaminase-Tests mit Zellextrakten und Proteinisolaten

Lysat-Überstände und isolierte Gesamtproteine der Bakterien, sowie angereicherte Transaminase-Fractionen von *Alcaligenes faecalis* DSM 4115 und von DSM 4113 wurden mit 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 10 mM NaCl (pH 7,0) auf einen Proteingehalt zwischen 20 und 60 mg/ml eingestellt und im Standardansatz mit 80 mM L-Glutaminsäure als  $\text{NH}_2$ -Donator und 20 mM Natrium-(3-carboxy-3-oxo-propyl)-methylphosphinat bei 30°C inkubiert. Je nach Versuchsbedingungen wurden zwischen 0 und 24 h Inkubationszeit 100  $\mu$ l-Proben abgenommen, die Proteine 10 min. bei 95°C denaturiert, abzentrifugiert und die Reaktionsüberstände im AS-Analysator auf Phosphinothricin untersucht.

Kontrollreaktionen enthielten keine Donor-Aminosäure bzw. kein Natrium-(3-carboxy-3-oxo-propyl)-methylphosphinat oder wurden mit hitzedesaktivierten Proteinen (10 min. bei 95°C) durchgeführt.

Durch Zugabe von 10 mM Hydroxylamin als spezifischem Transaminase-Hemmstoff wurde die Phosphinothricin-Bildung völlig unterdrückt.

Die spezifischen Phosphinothricin-Transaminase-Aktivitäten wurden in nmol gebildetes Phosphinothricin pro mg Protein und Stunde angegeben. Die Transaminoreaktivitäten wurden in  $\mu$ mol Phosphinothricin pro Minute und mg Protein bzw. Liter angegeben (U/mg Protein; U/l). 1 Unit (U) entspricht dem Umsatz zu 1  $\mu$ mol L-Phosphinothricin/min.

5 a) L-Phosphinothricin (PTC)-Synthese mit Lysat-Überständen  
(ungereinigt)

10	Stämme	Enzymaktivitäten:	Ausbeuten an L-PTC (nach 20 h Reaktionszeit):	Umsatzraten (nach 20 h Reaktionszeit)
15			(Ausgangskonzentrationen:	
			12 g/l L-Glutamat, 4 g/l	
20			L-Keto-PTC):	
	Alcali-	0,1 U/mg Protein	3,6 g/Liter	90 %
25	genes	(2500 U/Liter)		
	faecalis			
	DSM 4115			
30	DSM 4113	0,04 U/mg Protein	3,8 g/Liter	95 %
		(2000 U/Liter)		
	E. coli	0,02 U/mg Protein	3,2 g/Liter	80 %
35	(DH1)	(900 U/Liter)		

40 b) L-PTC-Synthese mit isolierten Gesamtproteinen (mit  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> gereinigt)

45	Stämme	Enzymaktivitäten:	Ausbeuten an L-PTC (siehe 4a)	Umsatzraten (siehe 4a)
	Alcali-	0,05 U/mg Protein	3,8 g/Liter	95 %
	genes	1000 U/Liter		
50	faecalis			
	DSM 4115			
	E. coli	0,01 U/mg Protein	3,6 g/Liter	90 %
55	(DH1)	500 U/Liter		

c) L-PTC-Synthese mit gereinigtem Transaminase-Enzym

5	Stämme	Enzymaktivitäten:	Ausbeuten an L-PTC (siehe 4a)	Umsatzraten (siehe 4a)
10	Alcaligenes faecalis	0,5 U/mg Protein 10000 U/Liter	3,9 g/Liter	97,5 %
15	DSM 4115			
	DSM 4113	0,2 U/mg Protein 6000 U/Liter	3,8 g/Liter	95 %

20 Beispiel 5

## Tests auf Stereoselektivität der Phosphinothricin-Synthese

25 Die Stereospezifität der Phosphinothricin-Bildung durch Transaminierung wurde mit Hilfe der N-Acetyltransferase-Reaktion überprüft. Dieses Enzym wurde in einigen Bodenbakterien nachgewiesen (beispielsweise Deutsche Patentanmeldung P 36 28 747.4) und kann nach bekannten Methoden isoliert werden. Es reagiert stereospezifisch nur mit L-Phosphinothricin, welches in einer Acetyl CoA-abhängigen Reaktion quantitativ in das entsprechende N-Acetyl-Derivat überführt wird.

30 Im Test wurden Reaktionsüberstände aus Beispiel 4, in denen Phosphinothricin durch Transaminierung gebildet worden war, mit Protein aus *Alcaligenes faecalis* DSM 4115 (auf 1 mg/ml) und 10 mM Acetyl CoA über 5 h bei 30°C inkubiert. Die Reaktionsüberstände wurden dann erneut auf nicht umgesetztes Phosphinothricin im AS-Analysator gemessen.

35 Das durch Transaminierung enzymatisch gebildete Phosphinothricin konnte jeweils durch die N-Acetyltransferase-Reaktion vollständig abgebaut werden. Dies beweist die Stereoselektivität der Transaminierung. Es wird reines L-Phosphinothricin gebildet.

Beispiel 640 Selektion von *Escherichia coli* ATCC 11303

45 *Escherichia coli* ATCC 11303 wurde nach konventionellen Methoden kultiviert und mit N-Methyl-N-nitro-N-nitroguanidin (MNG) mutagenisiert gemäß E. Adelberg et.al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 18, 788 (1965). Die mit MNG behandelten Zellen wurden auf einen autoklavierten Agar mit folgender Zusammensetzung ausgestrichen:

Fumarsäure 5 g/l  
Fleischextrakt 20 g/l  
Asparaginsäure 20 g/l  
50 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g/l  
MgSO<sub>4</sub> • 7 H<sub>2</sub>O 0,5 g/l  
CaCl<sub>2</sub> • 2 H<sub>2</sub>O 0,1 g/l  
Agar 20 g/l

55 pH 7,2 wurde mit Natronlauge eingestellt.

Eine sterilfiltrierte Lösung von Phenylpyruvat wurde in den noch heißen Agar eingegossen, so daß eine Endkonzentration von 24 g/l Phenylpyruvat erreicht wurde. Die Platten wurden bei 37 °C 4 Tage inkubiert. Kolonien mit einem Durchmesser von > 1 mm wurden isoliert. 20 % der wachsenden Stämme hatten eine erhöhte Transaminaseaktivität im Vergleich zum Ausgangsstamm.

- 5 Die Transaminaseaktivitätsbestimmung wurde mit dem Sigma Test-kit G 0390 durchgeführt.

#### Beispiel 7

- 10 a. Isolierung und Verdauung des Cosmids pIMS 6026 aus E. coli.

Das Cosmid pIMS6026 leitet sich von dem Cosmid pLAFR1 (ATCC 37167) dadurch ab, daß in dessen einzige EcoRI Schnittstelle das handelsübliche EcoRI Fragment kloniert wurde, auf dem das Kanamycin-Resistenzgen des Transposons Tn 903 liegt (Pharmacia, Upsala, Schweden). Durch Verdauung mit BamHI und anschließende Religation kann der größte Teil des handelsüblichen EcoRI Fragments deletiert werden, so daß nur ein kurzes Stück DNA als Insertion zurückbleibt, in der eine BamHI-Schnittstelle von 2 EcoRI-Schnittstellen flankiert wird.

Zur Isolierung des Cosmids pIMS 6026 aus E. coli HB101 wurde entweder nach Humphreys et al. vorgegangen [Biochem. Biophys. Acta 383,457-63 (1975)] oder eine alkalische Lyse nach Birnboim und Doly [Nucleic Acids Res. 7, 1513 (1979)] im 10-fach größeren Maßstab durchgeführt. In jedem Fall wurde die Plasmid-DNA mindestens einmal durch CsCl/EtBr-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt.

Das Cosmid pIMS 6026 wurde vollständig mit dem Restriktionsenzym BamHI verdaut, wobei nach den Angaben des Herstellers, New England Biolabs, verfahren wurde. Zur Überprüfung der Vollständigkeit dieser Verdauung wurde ein Aliquot des Restriktionsansatzes auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen und der Elektrophorese unterworfen. Das Erscheinen nur einer Bande nach Anfärben mit Ethidiumbromid und Bestrahlung mit kurzwelligem UV-Licht (254nm) diente als Hinweis auf eine vollständige Verdauung. Von der verdauten Cosmid-DNA wurde das Restriktionsenzym durch Phenolisierung entfernt, die DNA mittels Ethanol gefällt, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und nach Trocknen unter Vakuum in einem geeigneten Volumen an TE-Puffer (10 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen. Wahlweise wurde noch eine Behandlung mit alkalischer Phosphatase nach den Angaben des Herstellers, Boehringer Mannheim, durchgeführt. Nach Zugabe von 1 µl an alkalischer Phosphatase (CIP) wurde 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert, das Enzym durch Phenolisierung aus dem Reaktionsansatz entfernt und die DNA, wie oben beschrieben, gereinigt. Schließlich wurde sie in TE-Puffer resuspendiert.

- 35 b. Partielle Verdauung der DNA aus E. coli ATCC 11303

Die Isolierung der Gesamt-DNA aus E. coli ATCC 11303 wurde nach der Methode von Marmur in J. Mol. Biol. 53, 155-162, (1961) durchgeführt. Die isolierte Gesamt-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym Sau3A partiell verdaut, so daß hauptsächlich Fragmente in einem Größenbereich von 20-30kb entstanden. Dazu wurde in Vorversuchen das hierfür optimale Verhältnis von DNA und Enzym sowie die optimal Einwirkdauer des Enzyms auf die DNA festgestellt. Die entsprechende Vorgehensweise ist in dem von der Firma BRL herausgegebenen Heft "focus", Vol. 7, Nr 2 (1985) auf Seite 3 beschrieben. Nach Ablauf der als optimal bestimmten Reaktionszeit wurde das Enzym durch Erhitzen auf 65°C über einen Zeitraum von 10 Minuten zerstört und die Bildung von DNA-Fragmenten im gewünschten Größenbereich durch Agarose-Gelelektrophorese mit geeigneten DNA-Markern, z.B. mit EcoRI-verdauter DNA des Phagen λ, überprüft.

- 50 c. Ligation der Restriktionsansätze

Mit Sau3A partiell verdaute Gesamt-DNA aus E. coli ATCC 11303 wurde mit pIMS 6026 Cosmid-DNA, die mit BamHI vollständig gespalten und mit alkalischer Phosphatase behandelt worden war, in einem molaren Verhältnis von etwa 1 : 5 zusammengegeben. Die resultierende Mischung wurde mit einem mehrfach konzentrierten Puffer nach den Angaben von New England Biolabs so versetzt, daß eine für das Enzym T4-DNA-Ligase optimale Ionenkonzentration resultierte, und mit 1 µl des Enzyms mindestens 14 Stunden lang bei 16°C inkubiert. Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug dabei 50 µl mit einer Gesamt-DNA-Konzentration von 20 µg/ml.



d. Verpackung in  $\lambda$ -Phagen

Nach erfolgter Ligase-Reaktion wurde nach Beispiel 3 erhaltene DNA in vitro in die Köpfe von  $\lambda$ -Phagen verpackt. Die dafür notwendigen Extrakte aus zwei verschiedenen Bakterienstämmen können nach Hohn, B., in Wu, R., editor: Recombinant DNA, Methods in Enzymology, Vol. 68, Academic Press, New York, S.299-309 (1979) gewonnen werden oder von Boehringer Mannheim oder Amersham Buchler, Braunschweig, bezogen werden.

3  $\mu$ l der nach Beispiel 3 erhaltenen Mischung wurden mit unmittelbar zuvor aufgetauten Bakterien-Extrakten der Firma Amersham unter Eiskühlung gründlich vermischt. Die Mischung wurde 30-60 Minuten bei 20°C inkubiert und anschließend 200  $\mu$ l SM-Puffer (100 mM NaCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,01 % Gelatine) zugegeben. Diese Mischung wurde entweder direkt in eine Transduktions-Reaktion eingesetzt oder nach Zugabe von 10  $\mu$ l Chloroform bis zur späteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

## e. Transduktion von E. coli DG 30

5 ml L-Broth, bestehend aus 1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt und 0,5 % NaCl, wurden 0,4 % Maltose zugesetzt und mit 50  $\mu$ l einer Flüssigkultur von E. coli DG 30 in der stationären Wachstumsphase beimpft. Es wurde 12 Stunden bei 37°C inkubiert, bis die frühe stationäre Phase erreicht war. Die Bakterien wurden abzentrifugiert und vorsichtig in 2,5 ml einer wäßrigen Lösung, die 10 mmolar an MgCl<sub>2</sub> war, resuspendiert. 10  $\mu$ l der Mischung gemäß Beispiel 4 wurden mit 20  $\mu$ l der konzentrierten Bakteriensuspension versetzt und 50 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde 200  $\mu$ l L-Broth hinzugegeben und 1 Stunde bei 37°C inkubiert, wobei die Mischung gelegentlich geschüttelt wurde.

Jeweils 50  $\mu$ l des Ansatzes wurden auf L-Broth-Agar, der 20  $\mu$ g/ml Tetracyclin enthielt, ausplattiert. Die Platten wurden mindestens 12 Stunden bei 37°C bebrütet. Bei der beschriebenen Vorgehensweise konnten aus einem Ansatz durchschnittlich 1000 Kolonien erhalten werden.

## f. Selektionierung von E. coli DG 30 mit einem aspC-oder ilvE-oder tyrB-Gen.

Rund 800 Kolonien, die nach Transduktion von E. coli DG 30 nach dem beschriebenen Verfahren auf L-Broth-Agar, der 20  $\mu$ g/ml tetracyclin enthielt, erhalten worden waren, wurden auf Minimalagar "gepickt". Der Minimalagar bestand aus M9-Medium mit Glukose (Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor, 1972), das durch die Aminosäuren Isoleucin, Leucin, Valin, Asparaginsäure und Phenylalanin supplementiert worden war. Die Aminosäure Tyrosin, die der Stamm DG 30 gleichfalls nicht mehr synthetisieren kann, wurde dem Medium jedoch nicht zugegeben. Von den 800 "gepickten" Kolonien konnten 7 auf dem Minimalmedium anwachsen.

Zur Unterscheidung der drei möglichen Gene aspC, ilvE und tyrB in E. coli DG 30 wurden diese 7 Kolonien wie derum auf oben genanntes Minimalmedium "gepickt", das mit den aufgeführten Aminosäuren supplementiert war, bis auf jeweils eine, für die eine der Transaminasen, die von einem der Gene codiert wird, Substratspezifität zeigt.

Das Ergebnis ist in der nachstehenden Tabelle aufgeführt:

Klon Minimalmedium, suppl mentiert bis auf v rmut-liches

	Asp	Leu	Il	tyr	Gen
1	+	+	-	+	tyrB
2	+	+	-	+	tyrB
3	-	+-	+	+-	ilvE
4	-	+-	+	+-	ilvE
5	+	+	-	+	tyrB
6	+	+	-	+	tyrB
7	-	+-	+	+-	ilvE

+ = gutes Wachstum

+- = schlechtes Wachstum

- = kein Wachstum

#### g. Lokalisierung des tyrB-Gens

Durch Minilyse nach Maniatis et al., Cold Spring Harbor, Seiten 366-370 (1982), wurde Cosmid-DNA der Klone 1 bis 7, die gemäß Beispiel 6 erhalten wurden, gewonnen. Anschließend wurde diese Cosmid-DNA in E. coli DH1 (ATCC 33849) eingeschleust, woraus sie in guten Ausbeuten wieder reisoliert werden konnte. Es wurde Plasmid-DNA, die ursprünglich aus dem Klon 3 von E. coli DG 30 (siehe Beispiel 6) gewonnen wurde, aus dem mit dieser DNA transformierten Stamm E. coli DH 1 isoliert und mit den Restriktionsenzymen Sall und SmaI, den Angaben des Herstellers, New England Biolabs, folgend, vollständig verdaut. Gleichfalls vollständig mit Clal verdaut wurde der Vektor pAT 153, der anschließend noch einer Behandlung mit alkalischer Phosphatase unterzogen wurde. Die beiden DNAs wurden zusammengegeben, nach der in Beispiel 4 bereits beschriebenen Art und Weise miteinander ligiert und kompetente Zellen des Stammes E. coli ATCC 11303 mit einem Aliquot des Ligase-Ansatzes, z.B. 10 µl, transformiert. Resistente Kolonien wurden auf L-Broth-Platten, die 50 µg/ml Ampicillin enthielten, selektioniert und durch "replica plating" auf L-Broth-Platten mit 20 µg/ml Tetracyclin auf Markerinaktivierung und damit Einbau getestet. Aus Kolonien, die den Phänotyp AprTcs aufwiesen, wurde durch Minilyse Plasmid-DNA isoliert und durch vollständige Verdauung mit dem Restriktionsenzym Clal das Vorhandensein von Clal-Fragmenten in dem Vektor pAT153 überprüft.

#### h. Überprüfung der Transaminase-Aktivität

Die gemäß Beispiel 7 erhaltenen Klone wurden mittels APPAT-Test (Aspartat-Phenylpyruvat-Aminotransferase Assay, Sigma Testkit GO390, wobei  $\alpha$ -Ketoglutarat durch Phenylpyruvat ersetzt wurde) auf die Aktivität der aromatischen Transaminase, also des Genprodukts von tyrB, getestet. Als Vergleich diente der nicht transformierte Ausgangsstamm E. coli ATCC 11303. Dabei konnte in einem Fall eine deutliche Zunahme an tyrB-Aktivität, und zwar um den Faktor 5 bis 10, gegenüber dem Ausgangsstamm E. coli ATCC 11303, gemessen werden.

Durch Agarose-Gelelektrophorese unter Verwendung geeigneter Marker konnte gezeigt werden, daß in dem Stamm, der erhöhte tyrB-Genaktivität aufwies, ein pAT 153-Vektor enthalten war, der ein rund 2,7 MD großes Clal-Fragment eingebaut enthält. Wurde mit der isolierten Plasmid-DNA erneut der plasmidlose Stamm E. coli ATCC 11303 transformiert, so konnte in jedem Fall eine Zunahme der tyrB-Genaktivität um den Faktor 5-10 beobachtet werden.

Die Transformation von E. coli 11303 mit dem ilvE-Gen erfolgt in analoger Weise.

Beispiel 8

## Herstellung von L-tertiär-Leucin

- 5 Ein gemäß Beispiel 6 selektionierter Stamm von *Escherichia coli* ATCC 11303 wurde in folgender Nährlösung kultiviert:

Fumarsäure 10 g/l  
 Fleischextrakt 20 g/l  
 10 Asparaginsäure 8 g/l  
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g/l  
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,5 g/l  
 $\text{CsCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  0,1 g/l  
 3,3-Dimethyl-2-oxo-butansäure 4 g/l

- 15 pH 7,4 wurde mit Natronlauge eingestellt.

Nach 48 h Wachstum bei 37 °C wurden die Zellen abzentrifugiert. Im Überstand wurden mit Hilfe der HPLC auf einer RPC-8 Säule (mobile Phase: Gradient aus 100 mM Na-Acetat (pH 7,2) und Methanol) 0,9 g/l L-2-Amino-3,3-dimethyl-butansäure (tertiär-Leucin) bestimmt.

- 20 b. Zellmaterial wurde wie in Beispiel 8a angezogen und in einer Lösung aus 10 g/l Asparaginsäure, 4 g/l 3,3-Di-methyl-2-oxo-butansäure in 10 mmol/l Tris-HCl-Puffer (pH 7,4) unter Schütteln inkubiert. Nach 24 h bei 37°C konnten mit Hilfe der HPLC 1,9 g/l L-2-Amino-3,3-dimethyl-butansäure gemessen werden.

25 Beispiel 9

## Herstellung von L-Phosphinothricin

- Zellmaterial wurde wie in Beispiel 8 jedoch mit 4 g/l Dimethylpyruvat anstelle von 3,3-Dimethyl-2-oxo-butansäure angezogen. Nach 48 Stunden wurden die Zellen abzentrifugiert mit Puffer gewaschen und in einer wäßrigen Lösung aus 4 g/l Natrium-(3-carboxy-3-oxo-propyl)-methylphosphinat und 8 g/l Asparaginsäure-Natriumsalz in 10 mmol/l Tris/HCL (pH 7,4) 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert und im Überstand die gebildete Menge an L-Phosphinothricin durch HPLC-Analyse bestimmt. Es konnten 3,2 g/l Phosphinothricin bestimmt werden.

35

Beispiel 10

## Herstellung von L-Phosphinothricin mit rekombinanten Bakterien

- 40 Ein *E. coli* Stamm aus Beispiel 7 plasmidkodierter ilvE Transaminase-Aktivität wurde in folgender Nährlösung fermentiert:

Glucose 5 g/l  
 45  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  3,5 g/l  
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,8 g/l  
 $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$  12 g/l  
 $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  6 g/l  
 Mg  $\text{SO}_4$  0,2 g/l  
 50 Hefeextrakt 1 g/l

pH 7,0 wurde mit NaOH eingestellt

- Nach 4 h Wachstum wurde mit einer exponentiellen Glucosezufütterung zwischen 0,5 und 20 g/l/h begonnen. Nach 16 h Wachstum hatten die Zellen ein Trockengewicht von 20 g/l und eine Transaminase-aktivität von 15000  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{l}$ . Die Zellen wurden nach der Fermentation direkt ohne weitere Waschschr

55

itte in einem 100 ml Reaktionsansatz verwendet. Der Reaktionsansatz enthält in einem 10 mmol/l Tris/HCl-Puffer

(pH 7,4), 1500  $\mu\text{mol/min/l}$  Transaminaseaktivität, 0,1 ml Polyoxyethylen-Sorbitan-Monooleat ( $\text{\textcircled{R}}$ Tween 80), 90 mmol/l Natrium-(3-carboxy-3-oxo-propyl)-methylphosphinat und 200 mmol/l Glutaminsäure und wurde bei 37°C leicht geschüttelt. Nach 24 h wurden die Zellen abzentrifugiert und im Überstand L-Phosphinothricin mit HPLC-Analytik bestimmt. Es wurden 70 mmol/l L-Phosphinothricin bestimmt.

5

## Ansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von L-tetär-Leucin und L-Phosphinothricin, dadurch gekennzeichnet, daß  
 10 3,3-Dimethyl-2-oxo-butansäure und (3-carboxy-3-oxo-propyl) methylphosphinsäure bzw. die Salze dieser Verbindungen, jeweils in Gegenwart von Aminosäuren als Aminogruppendonatoren transaminiert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß mit Hilfe von Mikroorganismen transami-  
 niert wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß mit Hilfe von Mikroorganismen der  
 15 Gattungen *Paracoccus*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Agrobacterium* und *Streptomyces* sowie Entero-  
 bakterien transaminiert wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß mit Hilfe von *Alcaligenes faecalis*  
 DSM 4115 *Alcaligenes denitrificans* DSM 4114, *pseudomonas paucimobilis* DSM 4120, *Pseudomonas spec.*  
 4114, *Serratia plymuthica* DSM 4116, *Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli* DH1, *Escherichia coli*  
 20 ATCC 11303, *Enterobacter agglomerans* DSM 4122, *Enterobacter spec.* DSM 4121, *Paracoccus denitrifi-*  
*cans* DMS 65, *Streptomyces hygroscopicus* und *Streptomyces viridochromogenes* sowie 3 Bodenisolaten  
 DSM 45113, DSM 4117 und DSM 4118 transaminiert wird.
5. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß mit Hilfe von gentechnisch manipulierten  
 Mikroorganismen transaminiert wird.
- 25 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß mit Hilfe von *E. coli* ATCC 11303, der mit  
 einem ein *tyrB*-Gen oder ein *ilvE*-Gen enthaltenden Plasmid transformiert ist, transaminiert wird.
7. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß mit  
 Zellextrakten, isolierten Gesamtproteinen oder mit gereinigten Transaminasen transaminiert wird.
8. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß  
 30 Aminogruppendonator und  $\alpha$ -Ketosäure im Verhältnis 1:1 bis 5:1 eingesetzt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß Aminogruppendonator und  $\alpha$ -Ketosäure im  
 Verhältnis 1:1 bis 2:1 eingesetzt werden.
10. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die  
 Transaminierung bei einem pH-Wert im Bereich von 5 bis 9 durchgeführt wird.
- 35 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Transaminierung bei einem pH im  
 Bereich von 7 bis 8,5 durchgeführt wird.
12. *Alcaligenes faecalis* DSM 4115,  
*Alcaligenes denitrificans* DSM 4114,  
*Pseudomonas paucimobilis* DSM 4120,  
 40 *Pseudomonas spec.* DSM 4119,  
*Serratia plymuthica* DSM 4116,  
*Enterobacter agglomerans* DSM 4122,  
*Enterobacter spec.* DSM 4121  
 und die Bodenisolaten DSM 4113, DSM 4117 und DSM 4118 sowie deren Mutanten und Varianten, sofern  
 45 mit ihnen das Verfahren nach Anspruch 1 bis 10 durchzuführen ist.

50

55